

HYALURONIC ACID PRODUCTION PROMOTING AGENT

Publication number: JP6189780

Publication date: 1994-07-12

Inventor: KODAMA NOBUTSUGU; SHIMADA AKIYOSHI; OISHI YUICHI; SAKAI SHINGO; INOUE SHINTARO

Applicant: KANEBO LTD

Classification:

- International: **A61K8/00; A61K8/30; A61K8/41; A61K8/44; A61K31/195; A61P17/00; C12P19/26; C12R1/91; A61K8/00; A61K8/30; A61K31/185; A61P17/00; C12P19/00; (IPC1-7): C12P19/26; A61K7/00; A61K31/195; C12P19/26; C12R1/91**

- European:

Application number: JP19930172487 19930617

Priority number(s): JP19930172487 19930617; JP19920315789 19921030

Report a data error here

Abstract of JP6189780

PURPOSE:To provide the subject agent containing N-methyl-L-serine, ethanolamine, N-methylethanolamine or their salts, etc., acting on human- originated fibroblast cell and promoting the depressed hyaluronic acid productivity. **CONSTITUTION:**The objective hyaluronic acid production promoting agent having the form of cosmetic, bathing agent, pharmaceuticals, etc., acting on human-originated fibroblast cell and capable of promoting the hyaluronic acid productivity is produced by compounding one or more compounds selected from N-methyl- L-serine, ethanolamine, N-methylethanolamine and their salts in an amount of 0.001-3W/W% for N-methyl-L-serine or its salt, 0.001-1W/W% for ethanolamine or its salt and 0.00001-0.05 W/W% for N-methylethanolamine or its salt to an excipient or assistant such as petrolatum, squalane, higher alcohol, higher fatty acid lower alkyl ester and polyhydric alcohol, a surfactant such as polyethylene alkyl ether phosphate, etc.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-189780

(43) 公開日 平成6年(1994)7月12日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/26		7432-4B		
A 6 1 K 7/00		W 9164-4C		
	ADA C	9164-4C		
31/195		9283-4C		
# (C 1 2 P 19/26				

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平5-172487	(71) 出願人	000000952 鐘紡株式会社 東京都墨田区墨田五丁目17番4号
(22) 出願日	平成5年(1993)6月17日	(72) 発明者	小玉 修嗣 神奈川県小田原市寿町5丁目3番28号 鐘紡株式会社生化学研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平4-315789	(72) 発明者	島田 明美 神奈川県小田原市寿町5丁目3番28号 鐘紡株式会社生化学研究所内
(32) 優先日	平4(1992)10月30日	(72) 発明者	大石 祐一 神奈川県小田原市寿町5丁目3番28号 鐘紡株式会社生化学研究所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒアルロン酸産生促進剤

(57) 【要約】

【構成】 N-メチル-L-セリン、エタノールアミン、N-メチルエタノールアミン、またはそれらの塩からなる群より選択される1種以上の化合物を含有することを特徴とするヒアルロン酸産生促進剤。

【効果】 ヒト由来線維芽細胞に作用し、生理的および病的に低下したヒアルロン酸産生能を促進させることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 N-メチル-L-セリン、エタノールアミン、N-メチルエタノールアミン、またはそれらの塩からなる群より選択される1種以上の化合物を含有することを特徴とするヒアルロン酸産生促進剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は培養細胞または生体中のヒアルロン酸産生を促進するヒアルロン酸産生促進剤、または化粧品、医薬等に配合し、皮膚のヒアルロン酸産生能を高めることのできる、ヒアルロン酸産生促進剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 ヒアルロン酸は、細胞間隙への水分の保持、組織内にゼリー状のマトリックスを形成することに基づく細胞の保持、組織の潤滑性と柔軟性の保持、機械的障害などの外力への抵抗、および、細菌感染の防止など多くの機能を有している (BIO INDUSTRY、8巻、346頁、1991年)。

【0003】 たとえば、皮膚のヒアルロン酸は、齢をとるにつれて減少し、その結果、小ジワやかさつきなどの老化をもたらすといわれている。

【0004】 このような老化した皮膚の改善剤として、コラーゲンやヒアルロン酸を配合した化粧品が数多く提案されているが、表面の保湿効果が改善されるだけであり、本質的に老化肌を改善するものではない。その他、皮膚細胞賦活剤としてビタミン類や生薬類が使用されているが、やはり、老化肌の治療にまでは至っていないのが現状である。

【0005】 また、関節液中のヒアルロン酸は、関節軟骨の表面を覆い、関節機能の円滑な作動に役立っている。正常人関節液中のヒアルロン酸濃度は約2.3mg/mlであるが、慢性関節リウマチの場合、関節液中のヒアルロン酸濃度は約1.2mg/mlへと低下し、同時に関節液の粘度も著しく低下する (Arthritis Rheumatism、10巻、357頁、1967年)。

【0006】 また、化膿性関節炎や痛風性関節炎などでも慢性関節リウマチの場合と同様、ヒアルロン酸含量の低下が起こることが知られている [結合組織 (金原出版)、481項、1984年]。

【0007】 上記疾患において、潤滑機能の改善、関節軟骨の被覆・保護、疼痛抑制および病的関節液の性状改善をするために、関節液中のヒアルロン酸量を増加させることが考えられる。たとえば、慢性関節リウマチ患者にヒアルロン酸ナトリウムの関節注入療法を行うと、上記の改善が認められている (炎症、11巻、16頁、1991年)。

【0008】 同様に、外傷性関節症、骨関節炎や変形性関節症においても、ヒアルロン酸の関節注入療法により

上記の改善効果が報告されている [結合組織と疾患 (講談社)、246頁、1980年]。

【0009】 しかし、上記疾患の治療は長期にわたり、しかも医師の処方が必要とする。従って、日常生活の中で手軽に治療できるヒアルロン酸産生促進剤を含有させた軟膏あるいはゲルが望まれていた。

【0010】 また、熱傷受傷後の治癒過程で、壊死組織の下方から増生してくる肉芽組織の初期から組織全体が肉芽組織に置き換えられるまでの期間では、肉芽中にヒアルロン酸が著しく増加することが知られており [結合組織と疾患 (講談社)、153頁、1980年]、熱傷の初期の治療薬としても、ヒアルロン酸産生促進剤が期待されている。

【0011】 ヒト細胞のヒアルロン酸を産生促進する薬剤としてはインシュリン様成長因子-1や上皮成長因子 (Biochimica Biophysica Acta、1014、305頁、1989年) およびインターロイキン-1 (日本産科婦人科学会雑誌、41巻、1943頁、1989年) などのサイトカイン、あるいはフォルボールエステル (Experimental Cell Research、148巻、377頁、1983年) などが知られているが、いずれも化粧品、入浴剤や医薬品として安心して使用できるものではない。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】 従って本発明の目的とするところは、細胞によるヒアルロン酸産生能を促進させることにより、皮膚の老化防止あるいはヒアルロン酸の異常分解を伴う疾病の治療に使用でき、しかも人体に対する影響の少ない、安全なヒアルロン酸産生促進剤を提供するにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】 上述の目的は、N-メチル-L-セリン、エタノールアミン、N-メチルエタノールアミン、またはそれらの塩からなる群より選択される1種以上の化合物を含有することを特徴とするヒアルロン酸産生促進剤によって達成される。

【0014】 本発明において用いられるN-メチル-L-セリン、エタノールアミン、N-メチルエタノールアミン、またはそれらの塩は、低分子であるため、皮膚に塗布した場合、表皮層および基底膜を通過し、線維芽細胞の存在する真皮層 (結合組織) にまで到達することができ、線維芽細胞のヒアルロン酸産生能を促進させるのに有利である (後記試験例-7参照)。

【0015】 N-メチル-L-セリン、エタノールアミン、N-メチルエタノールアミン、またはそれらの塩は、公知の化合物であり、その製造方法は特に限定されるものではなく、通常用いられている方法でよい。本発明において、これらの化合物は、単独でも2種以上でも用いることができる。

【0016】 本発明のヒアルロン酸産生促進剤は、それ

自身で、培養細胞または生体細胞に適用して、ヒアルロン酸産生を促進することができ、化粧品、医薬の組成物等に配合して用いても良い。

【0017】本発明のヒアルロン酸産生促進剤および組成物の形態は、液剤、固形剤あるいは半固形剤のいずれでもよく、好ましくは軟膏、ゲル、クリーム、スプレー剤、貼付剤、ローション、パック類、乳液、パウダーおよび入浴剤等が挙げられる。

【0018】これらの組成物を製造するのに使用される賦形剤または補助剤は、通常、同目的に使用されるものから剤形に応じて適宜選択すればよく、特に限定されるものではないが、たとえば、ワセリン、スクワラン等の炭化水素、ステアリルアルコール等の高級アルコール、ミリスチン酸イソプロピルなどの高級脂肪酸低級アルキルエステル、ラノリン酸等の動物性油脂、グリセリン、プロピレングリコール等の多価アルコール、グリセリン脂肪酸エステル、モノステアリン酸ポリエチレングリコール、ポリエチレンアルキルエーテルリン酸等の界面活性剤、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸ブチル等の防腐剤、蝋、樹脂、各種香料、各種色素、クエン酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、乳酸等の各種無機塩や各種酸、水、およびエタノール等が挙げられ、得られた組成物の例としては、化粧品、入浴剤あるいは医薬品等が挙げられる。

【0019】N-メチル-L-セリン、エタノールアミン、N-メチルエタノールアミン、またはそれらの塩のヒアルロン酸産生促進剤中における含有量は、その形態により異なり、一概には規定できないが、適用組成物全体を100% (W/W) として、N-メチル-L-セリンまたはその塩の場合、0.001~3% (W/W) が好ましく、さらに好ましくは0.01~0.1% (W/W)、エタノールアミンまたはその塩の場合、0.001~1% (W/W) が好ましく、さらに好ましくは0.005~0.1% (W/W)、N-メチルエタノールアミンまたはその塩の場合、0.00001~0.05% (W/W) が好ましく、さらに好ましくは0.001~0.01% (W/W) である。ただし、入浴剤のように使用時に希釈されるものの場合は、さらに含有量を増やすことができる。

【0020】また、培養細胞にヒアルロン酸を産生させる時は、N-メチル-L-セリン(塩)の場合、細胞の培養液中に1mM以上含有させるのが好ましく、さらに好ましくは、1~10mM (0.012~0.12重量%)、エタノールアミン(塩)の場合、0.005重量%以上が好ましく、さらに好ましくは、0.005~0.1重量%、N-メチルエタノールアミン(塩)の場合、0.001重量%以上が好ましく、さらに好ましくは、0.001~0.01重量%である。

【0021】

【発明の効果】本発明のヒアルロン酸産生促進剤をヒト

皮膚線維芽細胞の培養系に添加すると、濃度依存的にヒアルロン酸産生量が促進される(後記試験例-1、2参照)。このヒアルロン酸産生促進剤は、毒性が低く(後記試験例-3参照)、かつ皮膚刺激性も低かった(後記試験例-4~6参照)。また、本発明のヒアルロン酸産生促進剤(クリーム、ローション)を皮膚に塗布すると、表皮層と基底膜を通過し、線維芽細胞のある真皮層に到達する(後記試験例-7参照)。さらに、本発明のヒアルロン酸産生促進剤は、生体中のヒアルロン酸量を増加させることもできる(後記試験例-8参照)。したがって、本発明のヒアルロン酸産生促進剤は、安全性が高く、且つ線維芽細胞に作用し、病的あるいは生理的に低下した、皮膚などの結合組織のヒアルロン酸産生を促進することができる。

【0022】

【実施例】実施例に先立って、本発明の効果を示す試験例を記載する。なお、各試験に用いる試薬の調製法および測定法は次の通りである。

【0023】(a) MEM培地の調製法

Minimum Essential Medium (大日本製薬製、10-101) 10.6gにそれぞれ終濃度として1% (V/V) Non Essential Amino Acid (大日本製薬製、16-810)、0.1%ラクトアルブミン水解物(シグマ製、L-9010)、1mMピルビン酸ナトリウム(大日本製薬製、16-820)、1.2% (W/V) 炭酸水素ナトリウム、50mg/l 硫酸ストレプトマイシンを添加し、蒸留水を加えて1lとした後、炭酸ガスを吹き込んでpHを約7にした(以下MEM培地と略記する)。

【0024】(b) ウシ胎仔血清(FBS)の非働化 FBS (Irvine Scientific製)を56℃で30分間加熱処理した。

【0025】(c) PBSの調製法

塩化ナトリウム8g、塩化カリウム0.2g、リン酸水素二ナトリウム・12水塩2.9g、リン酸二水素カリウム0.2gを精製水1lに溶解し、Phosphate Buffered Saline (以下PBSと略す)とした。

【0026】(d) 緩衝液H

0.1M酢酸ナトリウムおよび0.02% (W/V) アジ化ナトリウム含有0.5M 2-(N-モルフォリン)エタンスルホン酸-水酸化ナトリウム緩衝液(pH6.0)。

【0027】(e) 緩衝液C

0.15M塩化ナトリウム、0.02% (W/V) アジ化ナトリウムおよび0.05%ブリッジ-35含有50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)。

【0028】(f) プロナーゼ溶液

200μg/mlプロナーゼ(カルピオケム-ベーリング・コーポレイション製、Streptomyces

griseus 由来)、0.15M塩化ナトリウムおよび0.02%アジ化ナトリウム含有0.5Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0)。

【0029】(g) ヒアルロニダーゼ溶液
6TRU/mlヒアルロニダーゼ(EC 4.2.2.1、生化学工業製、*Streptomyces hyalurolyticus* 由来)を含む緩衝液H。

【0030】(h) トリプシン溶液
0.1%トリプシン(シグマ製)含有PBS
【0031】

(i) PD-10カラムを用いた高分子量画分の分画法
試料溶液をPD-10カラム(ファールマシア製、セファデックスG-25を充填したゲルろ過脱塩カラム)に供すると、分子量5000以上の高分子量成分は2.5~4mlの画分に、分子量5000未満の低分子量成分は4~12mlの画分に回収される。

【0032】(j) 生細胞数の測定法
6穴プレートで培養された細胞株の培養上清を吸引除去した後、1ml/ウェルのPBSで各ウェルを3回洗浄した。

【0033】洗浄後の各ウェルに0.2mlのトリプシン溶液を加えることにより付着した細胞を遊離させた後、10%非働化FBSを含むMEM培地を加えた。

【0034】細胞を含むMEM培地20μlにトリパン・ブルー溶液20μlを混合し、生細胞数を測定した。

【0035】(試験例-1) ヒアルロン酸産生促進作用
1. 試験化合物:N-メチル-L-セリン

【0036】2. 試験方法:

細胞培養

正常ヒト線維芽細胞株[デトロイト551株(ATCC 30 CCL 110)]の細胞数を10%(V/V)の非働化FBSを含むMEM培地にて 1×10^5 個/mlに調整し、6穴プレート(ファルコン製)に2mlずつ播種し、95%(V/V)空気-5%(V/V)炭酸ガスの雰囲気下、37℃で2日間静置培養した。

【0037】培養上清を吸引除去し、PBSで2回およびMEM培地で1回それぞれ1ml/ウェルで洗浄後、MEM培地2mlを各ウェルに加え、95%(V/V)空気-5%(V/V)炭酸ガスの雰囲気下、37℃で1日間静置培養した。

【0038】培養上清を吸引除去し、PBSで1回洗浄およびMEM培地で1回それぞれ1ml/ウェルで洗浄した。

【0039】つぎに、終濃度0mM、0.1mM、1mM、3mMおよび10mMとなるようにN-メチル-L-セリンを添加した $1 \mu\text{Ci/ml}$ グルコサミン塩酸塩D-(1,6- ^3H (N)) (デュ・ボン製、NET-557A、以下 ^3H グルコサミンという)を含むMEM培地を2mlずつ各ウェルに添加し(全てn=3)、

ヒアルロン酸産生量の測定用とした。

【0040】さらに、 ^3H グルコサミンを含まない以外は上記と同じ組成の培地を添加し、生細胞数の測定用とした。

【0041】上記2種類のプレートを95%(V/V)空気-5%(V/V)炭酸ガスの雰囲気下、37℃で2日間静置培養した。

【0042】ヒアルロン酸産生量の測定

ヒアルロン酸産生量の測定用各ウェルから培養上清を回収し、100℃で10分間加熱した後、その中の0.72mlにプロナーゼ溶液0.08mlを加え、ヒアルロン酸に結合した蛋白質や、その他の培養液中に産生された蛋白質を分解させた。なお、各ウェルから得られた培養上清につき、同一の操作を2回行った。

【0043】37℃で18時間静置した後、100℃で10分間加熱処理し、プロナーゼを失活させた。

【0044】つぎに、上記反応混液0.8mlのうちの0.3mlずつを2つのチューブに入れ、一方には緩衝液H0.3mlを、他方にはヒアルロニダーゼ溶液0.3mlを加え、37℃で18時間静置した後、100℃で10分間加熱処理し、ヒアルロニダーゼを失活させた。

【0045】ヒアルロニダーゼ無添加およびヒアルロニダーゼ添加の上記各反応混液0.6mlのうち、それぞれ0.5mlを、0.15M塩化ナトリウム、0.02%アジ化ナトリウムおよび0.05%ブリッジ-35含有50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で平衡化したPD-10カラムに供し、2.5~4.0mlの高分子量画分を分取した。

【0046】各高分子量画分1.5mlのうちの1mlに10mlのシンチゾールEX-H(同仁化学研究所製)を添加し、液体シンチレーション・カウンター(アロカ製)により高分子量画分に取り込まれた ^3H 放射活性を測定した。

【0047】ヒアルロニダーゼ無添加で高分子量画分に取り込まれた ^3H 放射活性値(DPM/ウェル)から、ヒアルロニダーゼによってヒアルロン酸を特異的に分解したときの高分子量画分に取り込まれた ^3H 放射活性値(ベース)を引いた値をヒアルロン酸産生量(DPM/ウェル)とした。

【0048】3. 試験結果:種々濃度のN-メチル-L-セリンを添加したときの生細胞数および得られた培養上清中のヒアルロン酸産生量を測定した(表1)。その結果、N-メチル-L-セリンを添加しても、生細胞数には影響がなく、用量依存的にデトロイト551株のヒアルロン酸産生量が上昇することが分かった。

【0049】

【表1】

N-メチル-L-セリン濃度 (mM)	生細胞数 ($\times 10^5$ 個/ウェル)	ヒアルロン酸産生量 ($\times 10^4$ DPM/ウェル)
0	3.50 \pm 0.30	1.50 \pm 0.08
0.1	3.70 \pm 0.28	1.71 \pm 0.15*
1	3.55 \pm 0.35	1.80 \pm 0.15**
3	3.50 \pm 0.33	1.89 \pm 0.07**
10	3.70 \pm 0.15	2.35 \pm 0.25**
0mM N-メチル-L-セリン添加群に対する有意差検定 (ダンカン法) *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$		

【0050】(試験例-2) ヒアルロン酸産生促進作用
1. 試験化合物: エタノールアミン、N-メチルエタノールアミン

【0051】2. 試験方法: 試験例-1と同様にして、エタノールアミンおよびN-メチルエタノールアミンのヒアルロン酸産生量を測定した(表2)。 *

*【0052】3. 試験結果: エタノールアミンおよびN-メチルエタノールアミンは、用量依存的にヒアルロン酸産生を促進することが分かった。

【0053】

【表2】

エタノールアミンまたは N-メチルエタノールアミン	ヒアルロン酸産生量 ($\times 10^4$ DPM/ウェル)
0 mM (薬剤無添加群)	1.84 \pm 0.15
1 mM エタノールアミン	2.10 \pm 0.18*
10 mM エタノールアミン	2.35 \pm 0.26**
0.3mM N-メチルエタノールアミン	2.54 \pm 0.27**
1 mM N-メチルエタノールアミン	2.34 \pm 0.18**
※ 0mM (薬剤無添加群) に対する有意差検定 (ダンカン法) *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$	
※ 1mM エタノールアミンは0.0061% (W/W) に相当し、1mM N-メチルエタノールアミンは0.0075% (W/W) に相当する。	

【0054】(試験例-3) 急性毒性試験 (特開平4-1130号公報)

【0055】1. 試験化合物: N-メチル-L-セリン

【0056】2. 試験方法: 水およびN-メチル-L-セリンの水溶液(検体として5g/kg体重となるように調製)を0.2ml/kg体重の割合でICR系雄性マウス(5周齢、体重24~28g、一群5匹)に経口投与し、その後7日間マウスを観察した。

【0057】3. 試験結果: N-メチル-L-セリン投与群には、対照群(水だけを投与)と同様、全く死亡例は認められなかった。

【0058】(試験例-4) 皮膚累積刺激性試験

【0059】1. 試験化合物: N-メチル-L-セリン、エタノールアミン、N-メチルエタノールアミン

【0060】2. 試験方法: 日本在来種雄性家兎(体重約3kg)を用い、ドレイツ法 (Appraisal

of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics, 46頁、1959年、Edited and published by the editorial committee, association of food and drug officials of U. S. A.) に準じて試験した。

【0061】すなわち、毛を刈り取った家兎背部(3x4cm)に、塩酸にてpH7に調整した試験化合物の0.1% (W/V) 水溶液0.1mlを開放適用にて1日1回ずつ4日間塗布した。24時間後、皮膚の紅斑、浮腫、痂皮および亀裂状態を観察し、表3の評価基準にてそれぞれ紅斑、浮腫、痂皮および亀裂スコアを付けた。

【0062】

【表3】

評価基準	紅斑スコア	浮腫スコア	痂皮スコア	亀裂スコア
A	0	0	0	0
B	1	1	1	1
C	2	2	2	2
D	3	3	3	3

A : 紅斑なし、浮腫なし、痂皮なしおよび亀裂なし
 B : 軽度の紅斑、浮腫、痂皮または亀裂
 C : 中程度の紅斑、浮腫、痂皮または亀裂
 D : 強度の紅斑、浮腫、痂皮または亀裂

【0063】表3に挙げた紅斑スコア、浮腫スコア、痂皮スコアおよび亀裂スコアを合計して累積刺激スコアとした。

【0064】つぎに、累積刺激スコアより下記表4の基準に基づき、N-メチル-L-セリン、エタノールアミンおよびN-メチルエタノールアミンの刺激度を判定した。

【0065】

【表4】

軽度刺激	: 累積刺激スコア0~2未満
中程度刺激	: 累積刺激スコア2~6未満
強度刺激	: 累積刺激スコア6以上

*ン、エタノールアミンおよびN-メチルエタノールアミンの皮膚に対する累積刺激性は低いことが示された(表5)。

【0067】

【表5】

20

【0066】3. 試験結果: N-メチル-L-セリ*

試験化合物	累積刺激スコア	刺激度
N-メチル-L-セリン	0	軽度
エタノールアミン	0	軽度
N-メチルエタノールアミン	0	軽度

【0068】(試験例-5) 皮膚一次刺激性試験(特開平4-1130号公報参照)

【0069】1. 試験化合物: N-メチル-L-セリン、エタノールアミン、N-メチルエタノールアミン

【0070】2. 試験方法: 日本在来種雄性家兎(体重約3kg)を用い、ドレイツ法(Appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics, 46頁, 1959年, Edited and published by the editorial committee, association of food and drug officials of U. S. A.) に準じて試験した。

【0071】すなわち、毛を刈り取った家兎背部に擦傷部位(損傷皮膚)を作成し、損傷皮膚と正常皮膚のそれ

ぞれに、水0.1ml、またはN-メチル-L-セリンの1%(W/V)水溶液0.1ml、あるいは塩酸にてpH7に調整したエタノールアミン、N-メチルエタノールアミンの1%(W/V)水溶液0.1mlを、パッチテスト用絆創膏(1.2x1.6cm、リボンエイド登録商標、リパーテープ製薬製)に浸潤させて貼付した。24時間後、絆創膏を剥離し、皮膚の紅斑および浮腫状態を観察し、さらに絆創膏剥離の48時間後も同様に観察した。そして、表6の評価基準にてそれぞれ紅斑および浮腫スコアを付けた。

【0072】

【表6】

50

評価基準	紅斑スコア	浮腫スコア
紅斑なしおよび浮腫なし	0	0
極軽度の紅斑または浮腫	1	1
軽度の紅斑または浮腫	2	2
中程度の紅斑または浮腫	3	3
強度の紅斑または浮腫	4	4

*づき、一次刺激スコアを計算した。

【0074】

【数1】

【0073】表7に挙げた各スコアを求め、下記式に基*10

$$\text{一次刺激スコア} = \frac{A+B}{2} + \frac{C+D}{2} + \frac{E+F}{2} + \frac{G+H}{2}$$

【0075】

※ ※【表7】

A: 正常皮膚に絆創膏を貼付してから、24時間後の紅斑スコア
 B: 正常皮膚から絆創膏を剥離してから、48時間後の紅斑スコア
 C: 正常皮膚に絆創膏を貼付してから、24時間後の浮腫スコア
 D: 正常皮膚から絆創膏を剥離してから、48時間後の浮腫スコア
 E: 損傷皮膚に絆創膏を貼付してから、24時間後の紅斑スコア
 F: 損傷皮膚から絆創膏を剥離してから、48時間後の紅斑スコア
 G: 損傷皮膚に絆創膏を貼付してから、24時間後の浮腫スコア
 H: 損傷皮膚から絆創膏を剥離してから、48時間後の浮腫スコア

【0076】つぎに、一次刺激スコアより下記表8の基準に基づき、N-メチル-L-セリンの刺激度を判定した。

【0077】

【表8】

軽度刺激 : 一次刺激スコア0~2未満
 中程度刺激 : 一次刺激スコア2~5未満
 強度刺激 : 一次刺激スコア5以上

30

★エタノールアミン、N-メチルエタノールアミンの皮膚刺激性は低いことが示された(表9)。

【0079】

【表9】

【0078】3. 試験結果:N-メチル-L-セリン、★

試験化合物	一次刺激スコア	刺激度
N-メチル-L-セリン	0	軽度
エタノールアミン	0	軽度
N-メチルエタノールアミン	0.25	軽度

【0080】(試験例6)皮膚刺激性試験(ヒトパッチテスト、特開平3-227921号公報参照)

【0081】1. 試験化合物: N-メチル-L-セリン、エタノールアミンおよびN-メチルエタノールアミン

【0082】2. 被検者: 健康人19名

【0083】3. 試験方法: クローズドパッチテスト
 法(Journal of the Society o 50

f Cosmetic Chemist, 31巻, 97頁, 1980年)により、被検者の前腕部にKIチャンパーを用いて、塩酸にてpH7に調整した試験化合物の1%(W/V)水溶液0.05mlを24時間閉塞貼付し、パッチ除去1時間後および24時間後の皮膚反応を観察した。

【0084】4. 試験結果: N-メチル-L-セリン、エタノールアミンおよびN-メチルエタノールアミ

ンのいずれのパッチテストにおいても、パッチ除去1時間後および24時間後の両時点で1名の被検者に軽微な紅斑が認められただけで、皮膚刺激性はほとんどないと判断された。

【0085】(試験例-7) N-メチル-L-セリン、エタノールアミン、N-メチルエタノールアミンの皮膚透過性試験

【0086】1. 試験薬

後記実施例3、6、9、14、17のクリームおよびローション

【0087】2. ラット皮膚の調製

試験前日に剃毛したWistar系雄性ラットをエーテルで屠殺後、すみやかに腹部皮膚を剥離した。

【0088】3. 拡散セル実験法

図1に示す垂直型拡散セル装置(ケルコソ・エンジニアリング製、有効面積 8cm^2)を用い、セルを 32°C の空気恒温槽中に置き、レセプター側には等張リン酸緩衝液(1. 44%炭酸水素ナトリウムと2. 33%リン酸二水素カリウムで調製)45mlを入れ、ドナー側のラット腹部剥離皮膚に試料1gを塗布し($n=3$)、1、2、4および6時間後にレセプター槽の緩衝液を0. 2mlずつ採取し、ただちに -20°C で冷凍保存した。 *

*【0089】4. N-メチル-L-セリン、エタノールアミン、N-メチルエタノールアミンの定量法

凍結試料を融解後、10mM塩酸で適当な濃度に希釈し、アスパラチルグリシン(終濃度 $40\mu\text{M}$)を内部標準として加えた。外部標準にはアミノ酸分析標準液(A型)に、同濃度のアスパラチルグリシンおよびN-メチル-L-セリン、エタノールアミン、N-メチルエタノールアミン(終濃度 $10\mu\text{M}$)を添加して用いた。これら検体の定量はオ-フタルアルデヒド法を用いたポストカラム・アミノ酸分析法(リチウム法)(Analytical Biochemistry, 96巻, 298頁, 1979年)により行った。

【0090】5. 試験結果

図2および表10に結果を示す。N-メチル-L-セリン(実施例3)はラット皮膚を透過し、クリーム塗布後2~6時間の透過速度は約 $0. 12\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{時間}$ であった(図2)。また、エタノールアミン(実施例6、14)、N-メチルエタノールアミン(実施例9、17)も皮膚を透過することが分かった(表10)。

【0091】

【表10】

実施例	レセプター槽中のエタノールアミンまたはN-メチルエタノールアミン濃度 $\mu\text{mol}/\text{ml}$	
	2時間後	6時間後
6	0. 15	0. 63
9	0. 18	0. 69
14	0. 43	0. 87
17	0. 47	1. 04

【0092】(試験例-8) ラット皮膚中のヒアルロン酸量に及ぼす影響

【0093】1. 試験化合物: N-メチル-L-セリン

【0094】2. 皮膚中のヒアルロン酸量の測定方法

ラット皮膚からのヒアルロン酸の抽出

ヘアレスラットをエーテルで屠殺後、すみやかに背部皮膚を剥離した。

【0095】各皮膚(100~300mg)を30mlの0. 5M酢酸ナトリウムで3回洗浄し、つぎに15Mのメタノール/クロロホルム溶液(7: 3, V/V)で3回脱脂した。皮膚を細切し、皮膚100mgあたり2. 4mlの0. 15M塩化ナトリウムを加え、ヒストロン(日音医理工器社製)を用いて28, 000rpm、30秒間、2回ホモジナイズした後、 121°C で20分間加熱処理した。

【0096】加熱処理した皮膚試料を冷却後、1/9容

量の5mg/mlプロナーゼE(メルク社製)含有1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7. 9)を加え、 37°C で2日間振盪した。 100°C で10分間加熱処理し、プロナーゼを失活させた後、3000rpmで3分間遠心分離し、上清を得た(以下、抽出液という)。

【0097】抽出液中のヒアルロン酸量の測定

上記で得られた抽出液を0. 5mlずつに分けて、0. 2M酢酸で平衡化したセファデックスG-50カラム(1. 5x5cm)に供し、ヒアルロン酸を2. 0~3. 5mlの高分子量画分に溶出させ、同一の抽出液由来の高分子量画分を混合した。各高分子量画分混合液を凍結乾燥した後、1. 5mlの緩衝液Hで溶解した。

【0098】上記溶解液1. 5mlのうち、一方のチューブに950 μl を取り、それに50 μl の200TRU/mlヒアルロニダーゼ含有緩衝液Hを加え(ヒアルロニダーゼ処理サンプル)、また、他方のチューブに475 μl を取り、それに525 μl の緩衝液Hを加えた

(未処理サンプル)。60℃で18時間静置した後、100℃で10分間加熱処理し、ヒアルロニダーゼを失活させた。

【0099】ヒアルロニダーゼ処理サンプルおよび未処理サンプルを0.5mlずつに分けて、0.2M酢酸で平衡化したセファデックスG-50カラム(1.5x5cm)に供し、2.0~3.5mlの高分子量画分を得た。それぞれのサンプル由来の高分子量画分を混合し、凍結乾燥した後、0.22mlの0.5M塩化ナトリウム含有10mMクエン酸-水酸化ナトリウム(pH3.5、以下緩衝液Dという)で溶解した。

【0100】上記0.22mlの各溶液のうち、0.2*

皮膚1g当りのヒアルロン酸量(μg)

$$= (A - B) \times \frac{194.14 + 221.21 - 36.04}{194.14} \times \frac{1}{\text{皮膚重量 (g)}}$$

A {ヒアルロニダーゼ未処理サンプルのグルクロン酸量(μg)}

$$= a \times 0.5 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ ml}}{0.475 \text{ ml}} \times \frac{0.22 \text{ ml}}{0.2 \text{ ml}}$$

B {ヒアルロニダーゼ処理サンプルのグルクロン酸量(μg)}

$$= b \times 0.5 \text{ ml} \times \frac{1.5 \text{ ml}}{0.95 \text{ ml}} \times \frac{0.22 \text{ ml}}{0.2 \text{ ml}}$$

【0103】a; ヒアルロニダーゼ未処理サンプルのグルクロン酸定量値(μg/ml)

b; ヒアルロニダーゼ処理サンプルのグルクロン酸定量値(μg/ml)

194.14; グルクロン酸の分子量

221.21; N-アセチルグルコサミンの分子量

36.04; 水2分子の分子量

【0104】3. 試験対象: 6週令または14週令のWistar系雄性ヘアレスラット、1群6匹

【0105】4. 試験方法: 6週令および14週令のヘアレスラット各群の皮膚中のヒアルロン酸量を、上記の方法に従って算出した。また、6週令から、50%(V/V)エタノール(対照薬)または10%(W/V)N-メチル-L-セリン含有50%(V/V)エタノール(試験薬)を、それぞれ1日1回、0.1mlずつ背部に60日間連続塗布し、14週令となったラット2群の、皮膚中のヒアルロン酸量を、上記の方法に従って算

*mlを緩衝液Dで平衡化したDEAE-セファロースカラム(カラム体積0.1ml)に供し、非吸着画分0.2mlを得た。さらに、0.3mlの緩衝液Dでカラムを洗浄し、その洗浄画分と非吸着画分を混合した。

【0101】上記混合液を用いて、ヒアルロン酸の二つの成分のうちの一つであるグルクロン酸をBitterらの方法(Analytical Biochemistry, 4巻, 330頁, 1962年)に従って定量し、下記の数2により、皮膚中のヒアルロン酸量を算出した。

【0102】

【数2】

出した。

【0106】5. 試験結果: 6週令および14週令のラット皮膚中のヒアルロン酸量を測定した結果を表11に示す。その結果、6週令ラットの皮膚1gあたりのヒアルロン酸量(333±16μg)に比べて、14週令ラットの皮膚1gあたりのヒアルロン酸量(216±21μg)は有意に低かった(p<0.01)。これは、ラット皮膚中のヒアルロン酸量は、加齢により低下することを示している。

【0107】また、表12から明らかなように、対照薬を塗布した群(204±14μg)は、表11に示した場合の14週令のラット(216±21μg)と同程度であったのに対し、試験薬を塗布した群(250±18μg)は有意に高く、N-メチル-L-セリンは、加齢によるヒアルロン酸量の低下を抑制している。

【0108】

【表11】

検体番号	ラット皮膚1gあたりのヒアルロン酸量 (μ g)	
	6週令	14週令
1	355	195
2	306	296
3	293	234
4	402	220
5	314	220
6	335	133
平均値±標準誤差 333±16 216±21		

【0109】

* * 【表12】

検体番号	ラット皮膚1gあたりのヒアルロン酸量 (μ g)	
	対照薬群	試験薬群
1	246	306
2	150	224
3	230	195
4	191	222
5	224	259
6	189	289
平均値±標準誤差 204±14 250±18		

【0110】以下に本発明の実施例を挙げる。なお、表中の値は重量%を示す。

下記に示す組成でクリームを調製した。

【0112】

【0111】実施例1～9（クリーム）

30 【表13】

配 合 組 成	実 施 例								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A セタノール 親油型モノステアリン酸グリセリン ポリオキシエチレンセチルエーテル (20E. O.) 流動パラフィン トリ-2-エチルヘキサン酸グリセリン メチルポリシロキサン	3 2.5 1.5 10 5 1	3 2.5 1.5 10 5 1	3 2.5 1.5 10 5 1	3 2.5 1.5 10 5 1	3 2.5 1.5 10 5 1	3 2.5 1.5 10 5 1	3 2.5 1.5 10 5 1	3 2.5 1.5 10 5 1	3 2.5 1.5 10 5 1
B パラオキシ安息香酸ブチルエステル	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C パラオキシ安息香酸メチルエステル エデト酸二ナトリウム N-メチル-L-セリン エタノールアミン N-メチルエタノールアミン	0.15 0.1 0.01 0 0	0.15 0.1 0.1 0 0	0.15 0.1 2 0 0	0.15 0.1 0 0.01 0	0.15 0.1 0 0.1 0	0.15 0.1 0 2 0	0.15 0.1 0 0 0.001	0.15 0.1 0 0 0.01	0.15 0.1 0 0 0.01
D N-ステアロイル-L-グルタミン酸Na ジプロピレングリコール 水	0.9 5 残量	0.9 5 残量	0.9 5 残量	0.9 5 残量	0.9 5 残量	0.9 5 残量	0.9 5 残量	0.9 5 残量	0.9 5 残量
合 計	100	100	100	100	100	100	100	100	100

【0113】調製法：成分(A)を80℃で均一に混合溶解した後、それに成分(B)を混合溶解した(混合液I)。これとは別に、成分(D)を80℃で均一に混合溶解した後、それに成分(C)を混合溶解した(混合液II)。つぎに、混合液Iに、徐々に混合液IIを加えて、充分攪拌しながら30℃まで冷却し、クリームを得

た。

【0114】実施例10~17(ローション)
下記に示す組成でローションを調製した。

【0115】

【表14】

配 合 組 成	実 施 例							
	10	11	12	13	14	15	16	17
エタノール	5	5	5	5	50	5	5	50
グリセリン	5	5	5	5	5	5	5	5
ポリオキシエチレン硬化 ヒマシ油(60E.O.)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
メチルパラベン	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
香料	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
N-メチル-L-セリン	0.01	0.1	0	0	0	0	0	0
エタノールアミン	0	0	0.01	0.1	2.5	0	0	0
N-メチルエタノールアミン	0	0	0	0	0	0.001	0.01	2.5
精製水	残量	残量	残量	残量	残量	残量	残量	残量
合 計	100	100	100	100	100	100	100	100

【0116】調製法： 各成分を混合溶解して、ローションを調製した。 * 【0118】
【表15】

【0117】実施例18~20（入浴剤） *

配 合 組 成	実施例18	実施例19	実施例20
硫酸ナトリウム	85	85	85
香料および界面活性剤	適量	適量	適量
有機色素	適量	適量	適量
N-メチル-L-セリン	10	0	0
エタノールアミン	0	10	0
N-メチルエタノールアミン	0	0	10
炭酸水素ナトリウム	残量	残量	残量
合 計	100	00	100

【0119】調製法： 各成分を混合し、入浴剤を調製した。なお、この入浴剤は使用時に約3000倍に希釈される。

【0120】実施例21~26（軟膏）

【0121】

【表16】

配 合 組 成		実 施 例					
		21	22	23	24	25	26
A	スクワラン	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7
	白色ワセリン	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
	ステアリンアルコール	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7	8.7
	ミリスチン酸イソプロピル	6	6	6	6	6	6
	モノステアリン酸ポリエチレン	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3	1.3
	ポリオキシエチレンアルキルグリコール	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3
B	モノステアリン酸グリセリン	2	2	2	2	2	2
	パラオキシアン息香料	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	パラオキシアン息香料	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	プロピレングリコール	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7
	N-メチル-L-セリン	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
	エタノールアミン	0	0	0	0	0	0
水		残量	残量	残量	残量	残量	残量
合 計		100	100	100	100	100	100

【0122】調製法： 上記（B）の各成分を湯浴で80℃に加温しながら混合し、これを、80℃に加温した上記（A）の各成分の混合物中に攪拌しながら徐々に加えた。つぎに、ホモジナイザー（Tokusyukik 40 a Kogyo製）で2.5分間激しく攪拌（250

0rpm）して各成分を充分乳化分散させた後、攪拌しながら徐々に冷却して軟膏を得た。

【0123】実施例27～32（ゲル）

【0124】

【表17】

配 合 組 成		実 施 例					
		27	28	29	30	31	32
A	カルボキシビニルポリマー	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
B	エタノール	10	10	10	10	10	10
	ジイソプロパノールアミン	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	モノラウリン酸ポリオキシエチレン	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	ソルビタン(20 E. O.) 香料	適量	適量	適量	適量	適量	適量
C	グリセリン	5	5	5	5	5	5
	N-メチル-L-セリン	0.01	0.1	0	0	0	0
	エタノールアミン	0	0	0.01	0.1	0	0
	N-メチルエタノールアミン	0	0	0	0	0.001	0.01
D	水	残量	残量	残量	残量	残量	残量
合 計		100	100	100	100	100	100

【0125】調製法： (A)を一部の水(D)で膨潤 *て分散し、ゲルを得た。

させ、残りの水(D)で成分(C)を溶解させた後、両 20 【0126】実施例33~38(ヘマトニック)

者を均一に混合した(混合液I)。成分(B)を均一に 【0127】

混合解させた(混合液II)。混合液Iに混合液IIを加え* 【表18】

配 合 組 成		実 施 例					
		33	34	35	36	37	38
A	エタノール	70	70	70	70	70	70
	香料可溶化剤	適量	適量	適量	適量	適量	適量
	香料・色素	適量	適量	適量	適量	適量	適量
B	酢酸dl- α -トコフェロール	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
	塩酸アルキルジアミノエチル	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	グリチルリチン酸	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	プロピレングリコール	3	3	3	3	3	3
	l-メントール	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C	乳酸	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	キレート剤	適量	適量	適量	適量	適量	適量
	N-メチル-L-セリン	0.01	0.1	0	0	0	0
	エタノールアミン	0	0	0.01	0.1	0	0
	N-メチルエタノールアミン	0	0	0	0	0.001	0.01
	水	残量	残量	残量	残量	残量	残量
合 計		100	100	100	100	100	100

【0128】調製法： 香料可溶化剤で香料を溶解した後、常温で攪拌しながらエタノールに加えて溶解し、成分(B)を順次加えて溶解した(混合液I)。成分(C)を溶解させ、攪拌しながら混合液Iに加えて均一にした後、ろ過してヘマトニックを得た。

【図面の簡単な説明】

【図1】試験例-7で使用した垂直型拡散セル装置を示す図である。

【図2】試験例-7において、N-メチル-L-セリンの皮膚透過性試験を行った結果を表す図である。

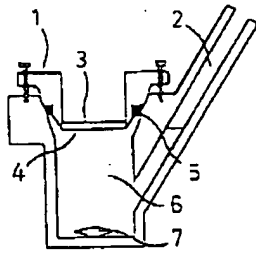
【符号の説明】

- 1 テフロン製ふた部
- 2 サンプリング口
- 3 薬物試料
- 4 皮膚
- 5 O-リング

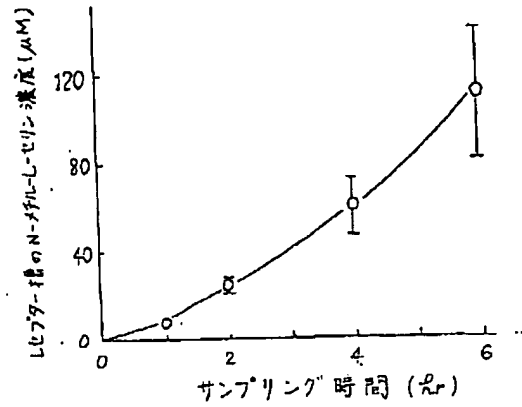
6 レセプター相

7 攪拌子

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F 1

技術表示箇所

C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 酒井 進吾

神奈川県小田原市寿町5丁目3番28号 鐘

紡株式会社生化学研究所内

(72)発明者 井上 紳太郎

神奈川県小田原市寿町5丁目3番28号 鐘

紡株式会社生化学研究所内